

University of Groningen

Immunology of pregnancy

Veenstra van Nieuwenhoven, Angélique Loraine

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2009

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Veenstra van Nieuwenhoven, A. L. (2009). *Immunology of pregnancy*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. [s.n.].

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Algemene discussie

General discussion

Tijdens een normale zwangerschap moet de maternale immuunrespons, zowel perifeer als lokaal in de uterus, zich aanpassen aan de aanwezigheid van de semiallogene foetus. Het verrichten van onderzoek naar de immuunrespons in de zwangerschap is daarom van groot belang om inzicht te krijgen in de normale fysiologie van de zwangerschap. Onderzoek naar de immuunrespons van pathologische zwangerschap, zoals bv. zwangerschappen gecompliceerd door preeclampsie, is eveneens van belang, niet alleen voor een beter inzicht in de immuunrespons van de normale zwangerschap, maar ook voor een beter inzicht in het pathologische proces wat ten grondslag ligt aan preeclampsie.

Zoals beschreven in dit proefschrift kunnen we binnen het immuunsysteem het specifieke en het niet-specifieke immuunsysteem onderscheiden. Niet-specifieke immuniteit vormt de eerstelijns verdediging tegen infecties. Het is een snel werkend aangeboren afweersysteem tegen bedreigende lichaamsvreemde stoffen en ziektekiemen. Cellen die dit systeem vertegenwoordigen zijn oa. monocytën, macrofagen, dendritische cellen en natural killer cellen (NK cellen). Het specifieke immuunsysteem, ook wel het adaptieve immuunsysteem genoemd, is een langzaamwerkend immuunsysteem dat na een eerste herkenning een geheugen functie opbouwt. Het specifieke systeem bestaat uit een cellulaire en een humorale respons, vertegenwoordigd door respectievelijk T lymfocyten en B lymfocyten.

In dit proefschrift is gekeken naar de aanpassingen van de perifere immuunrespons, zowel in het specifieke als het niet-specifieke immuunsysteem, aan in eerste instantie de normale zwangerschap en in tweede instantie preeclampsie. Als maat voor het functioneren van het immuunsysteem hebben we de cytokine productie capaciteit van monocytën (als onderdeel van het niet-specifieke immuunsysteem), NK cellen en lymfocyten (als onderdeel van het specifieke immuunsysteem) bestudeerd na stimulatie. Wij hebben gekozen voor monocytën, omdat deze cellen een belangrijke regulerende rol hebben in de niet-specifieke immuunrespons en bovendien het specifieke immuunsysteem kunnen activeren d.m.v. de productie van bepaalde cytokines zoals IL12. Voor het specifieke immuunsysteem hebben we gekeken naar T helper (Th) en T cytotoxische (Tc) cellen en hun type 1 cytokine productie, die een cellulaire immuunrespons induceren, en type 2 cytokine productie, die een humorale immuunrespons induceren (Mosman *et al.* 1996). Uit proefdieronderzoek werd nl. gesuggereerd dat type 1 cytokines schadelijk zijn voor de zwangerschap in tegenstelling tot type 2 cytokines. Wij verwachtten daarom dat na stimulatie van T cellen de productie van type 1 cytokines verlaagd zou zijn bij zwangere vrouwen in vergeleken met niet-zwangere vrouwen. Ook hebben we de cytokine productie capaciteit van perifere NK cellen bestudeerd, omdat de rol van NK cellen bij de implantatie van de blastocyst en vervolgens de placentatie steeds duidelijker wordt (Borzychowski *et al.* 2005; Brillard *et al.* 2007).

In het eerste deel van dit proefschrift is gefocust op de werking van het immuunsysteem in de normale zwangerschap. In onze studie die wordt beschreven in *hoofdstuk 2* is het percentage T cellen en NK cellen die type 1 of type 2 cytokines produceren in het derde trimester van de zwangerschap vergeleken met dezelfde parameters bij niet-zwangere vrouwen in de folliculaire fase. In *hoofdstuk 3* is onze studie beschreven die focust op het percentage cytokine producerende monocytën in het derde trimester van de zwangerschap vergeleken met dezelfde parameters bij niet-zwangere vrouwen in de folliculaire fase. Aansluitend op deze 2 studies naar de veranderingen in cytokine producerende immuuncellen in het derde trimester van de

zwangerschap, is in *hoofdstuk 4* een longitudinaal onderzoek beschreven, waarin gedurende de hele zwangerschap het verloop van de cytokine productie van monocyten en lymfocyten is bestudeerd.

Als laatste beschrijven we in *hoofdstuk 6* onze studie waarin we hebben gekeken naar het percentage cytokine producerende T cellen, NK cellen en monocyten in een pathologische zwangerschap, nl. preeclampsie.

Het immuunsysteem in de gezonde zwangerschap

Toen de in dit proefschrift beschreven experimenten werden opgestart, begon in de internationale literatuur het concept “zwangerschap is een Th2 respons, waarbij het niet-specifieke immuunsysteem geactiveerd is” vorm te krijgen. Op dat moment waren de meeste studies gedaan aan immuuncellen in de foetal-maternale interface, dus de placenta, de decidua en de uterus. Ook was onderzoek met name gefocust op T lymfocyten. Aangezien circulerend maternaal bloed in direct contact staat met de syncytiotrofoblast in de vlokken van de placenta, was te verwachten dat ook de perifere immuunrespons zich aan de zwangerschap aan zou passen. Onze vraagstelling was derhalve of de cytokine productie van circulerende monocyten, T cellen en NK cellen na stimulatie zou veranderen gedurende de zwangerschap. Aangezien in het derde trimester van de zwangerschap de oppervlakte van de vlokken in de placenta het grootst is, verwachtten wij dat als er veranderingen op zouden treden in het perifere immuunsysteem in de zwangerschap, die het best tot uiting zouden komen in dit trimester. Wij zijn onze studie daarom begonnen met het vergelijken van de cytokine productie van monocyten en lymfocyten in het derde trimester van de zwangerschap met de cytokine productie van monocyten en lymfocyten in niet-zwangere vrouwen. De niet-zwangere vrouwen bevonden zich in de folliculaire fase van de menstruele cyclus, omdat uit ons eerdere onderzoek in ons lab was gebleken dat vrouwen in de luteale fase van de menstruele cyclus al immunologisch waren voorbereid op een zwangerschap (Bouman *et al.* 2001). De bevindingen van deze studies in het derde trimester van de zwangerschap gaven aanleiding tot het opzetten van een longitudinale studie gedurende de hele zwangerschap.

Monocyten

De studie waarin we de LPS geïnduceerde cytokine productie van monocyten van zwangere vrouwen hebben vergeleken met monocyten cytokine productie van niet-zwangere vrouwen, was de eerste in zijn soort. Wel was al eerder aangetoond dat perifere monocyten geactiveerd waren tijdens de zwangerschap. Dit was gemeten aan de hand van de expressie van activatiemarkers, zoals CD14, CD18, CD64 en intracellulaire reactieve soorten zuurstof (intracellular reactive oxygen species). Deze waren verhoogd op monocyten van zwangere vrouwen in vergelijking met monocyten van niet-zwangere vrouwen (Sacks *et al.* 1998a; Naccasha *et al.* 2001).

In onze studie die wordt beschreven in *hoofdstuk 3* van dit proefschrift hebben we aangetoond dat monocyten niet alleen fenotypisch, maar ook functioneel veranderd zijn tijdens de zwangerschap. Hoewel het door LPS gestimuleerde percentage IL1 β producerende monocyten in zwangere vrouwen niet significant was veranderd t.o.v. niet-zwangere vrouwen, zagen we wel verschillen in het percentage monocyten dat TNF α of IL12 produceerde. Tijdens de zwangerschap was het percentage TNF α en IL12 producerende monocyten na LPS-stimulatie significant verlaagd tov het

percentage TNF α en IL12 producerende monocytten in vrouwen in de folliculaire fase van de cyclus. De laatste jaren zijn er nog een aantal studies verricht die TNF α productie van monocytten van zwangere vrouwen hebben vergeleken met TNF α productie van monocytten van niet-zwangere vrouwen (Elenkov *et al.* 2001; Sacks *et al.* 2003, Beckmann *et al.* 2004, Peracoli *et al.* 2007). Het is echter lastig deze studies met ons onderzoek te vergelijken, omdat in de meeste studies een andere methode werd gebruikt om de cytokine productie van monocytten te meten, nl. TNF α productie in het supernatant van de cellen (Beckmann *et al.* 2004, Peracoli *et al.* 2007, Elenkov *et al.* 2001). In deze studies werd geen verschil gevonden in TNF α concentratie in het supernatant na LPS-stimulatie van monocytten van zwangeren vergeleken met monocytten van niet-zwangeren. De methode in de studie van Sacks *et al.* was wel vergelijkbaar met de door ons gebruikte methode, nl het meten van intracellulaire cytokine productie. Echter, in de studie van Sacks *et al.* werden de monocytten gestimuleerd met LPS en IFN γ (Sacks *et al.* 2003) i.p.v. van alleen met LPS. Sacks *et al.* vonden geen verschil in het percentage TNF α producerende monocytten tussen zwangere en niet-zwangere vrouwen. Deze experimenten zijn echter niet helemaal vergelijkbaar met onze. Mogelijk was de gevoeligheid van monocytten voor IFN γ veranderd tijdens de zwangerschap. Hierdoor zou de veranderde respons op LPS door de monocytten van zwangere vrouwen mogelijk overschaduwd kunnen worden.

Ook voor wat betreft de productie van IL12 komt ons onderzoek niet altijd overeen met andere studies. Hoewel Sakai *et al.* and Amoudruz *et al.* ook een verlaging van de gestimuleerde IL12 productie tijdens de zwangerschap lieten zien, werd in dit onderzoek gewerkt met geïsoleerde perifere mononucleaire cellen i.p.v. met volbloed en werden de cellen gestimuleerd met PHA i.p.v. LPS (Amoudruz *et al.* 2006) of werden de cytokines in het supernatant gemeten (Sakai *et al.* 2002). In het onderzoek van Sacks *et al.* (2003) was het percentage IL12 producerende monocytten in de zwangerschap toegenomen vergeleken met dit percentage in niet-zwangere vrouwen, na stimulatie met lage concentraties LPS in combinatie met IFN γ (Sacks *et al.* 2003). In ons onderzoek werd een hogere dosering LPS (2 μ g/ml vs. 40ng/ml in het onderzoek van Sacks *et al.*) zonder IFN γ toegediend. Zoals hierboven beschreven zou de gevoeligheid voor IFN γ tijdens de zwangerschap toegenomen kunnen zijn, waardoor de effecten van LPS op de monocytten niet meer zichtbaar waren.

Uit bovenstaande blijkt dat de cytokine productie van monocytten in de zwangerschap na stimulatie veranderd lijkt te zijn vergeleken met de gestimuleerde cytokine productie van monocytten van niet-zwangere vrouwen. Het lijkt echter afhankelijk van de gebruikte methode of de IL12 en TNF α cytokine productie toeneemt of afneemt tijdens de zwangerschap. Uitgaande van onze eigen experimenten, lijkt de gestimuleerde productie van IL12 en TNF α verlaagd tijdens de zwangerschap. Hoewel dit tegenstrijdig lijkt met het feit dat monocytten in een pro-inflammatoire conditie zijn, is bekend dat al geactiveerde monocytten minder cytokines produceren na stimulatie met LPS. Dit fenomeen staat bekend als LPS-tolerantie (Munoz *et al.* 1991). Onze resultaten zouden er dus inderdaad op kunnen duiden dat monocytten tijdens de zwangerschap geactiveerd zijn.

Aansluitend op bovenstaande experimenten, hebben we in *hoofdstuk 4* beschreven wanneer de bovengenoemde veranderingen in de cytokine productie van monocytten tijdens de zwangerschap optraden. Er werd gedurende de zwangerschap geen verandering gezien in het percentage TNF α producerende monocytten na LPS-

stimulatie. Dit is in tegenstelling tot onze bevindingen beschreven in *hoofdstuk 3*, waar een significante daling van het percentage TNF α producerende monocytten werd gevonden in week 30 van de zwangerschap vergeleken met niet-zwangere vrouwen. Het is onduidelijk waarom de resultaten niet vergelijkbaar zijn. Mogelijk is dit het gevolg van een relatief kleine groep zwangeren die we bestudeerd hebben ($n = 10$) in onze longitudinale studie vergeleken met 17 zwangeren in de studie beschreven in *hoofdstuk 3*. Net als in onze studie uit *hoofdstuk 3*, waarin het derde trimester van de zwangerschap is beschreven, zagen we ook op eerdere tijdstippen in de zwangerschap geen veranderingen in LPS gestimuleerde percentage IL1 β producerende monocytten. Hoewel het percentage IL1 β producerende monocytten op geen enkel tijdstip in de zwangerschap significant verschilde van het percentage IL1 β producerende monocytten van niet-zwangere vrouwen, leek er toch een lichte stijging van het percentage IL1 β producerende monocytten te zijn vanaf 30 weken zwangerschapsduur. Dit zou kunnen betekenen dat de IL1 β productie van LPS gestimuleerde monocytten aan het eind van de zwangerschap toch verandert. Dit zou te maken kunnen hebben met de inductie van de partus. Het is bekend dat IL1 β in staat is prostaglandine productie (PGE2) te induceren. Aangezien PGE2 een belangrijke rol speelt in de partus (Wikland *et al.* 1984; Word *et al.* 1992; Egarter en Husslein 1992) zou verandering in de IL1 β productie van monocytten aan het eind van de zwangerschap een rol kunnen spelen in de inductie van de partus (Sadowsky *et al.* 2006; Jana *et al.* 2008).

Ook de resultaten voor wat betreft het percentage IL12 producerende monocytten na LPS-stimulatie zoals beschreven in *hoofdstuk 4* komen overeen met de beschreven resultaten in *hoofdstuk 3*. Ook in onze longitudinale studie, vonden we een significante daling van het percentage IL12 producerende monocytten in week 30 van de zwangerschap. Gedurende de gezonde zwangerschap liet de curve van het percentage IL12 producerende monocytten een sinus-achtige vorm zien. Het percentage IL12 producerende monocytten leek te stijgen tot 15 weken, waarna een daling volgde met een minimum op week 35, wederom gevolgd door een stijging aan het eind van de zwangerschap. De stijging in het eerste trimester lijkt tegenstrijdig met de algemene gedachte dat tijdens de zwangerschap de immuunrespons verschuift richting een Th2 respons, omdat bekend is dat IL12 een 'type 1 achtige' cytokine is: IL12 kan de productie van o.a. IFN γ en TNF α stimuleren (Brunda 1994). Deze twee cytokines staan bekend om het feit dat ze miskramen kunnen induceren in proefdieren (Yui *et al.* 1994; Hill *et al.* 1995). Echter, het wordt meer en meer duidelijk dat TNF α en IFN γ ook nodig zijn voor de fysiologische adaptatie van spiraal arteriën aan de zwangerschap (Ashkar *et al.* 2003; Hering *et al.* 2008). Uit proefdieronderzoek bleek inderdaad dat de positieve invloed van door monocytten geproduceerd TNF α bevestigd werd door o.a. de secretie en activatie van matrix metalloproteïnases (MMP)-2 en MMP-9, die bekend staan om hun stimulatie van vroege en late trofoblast invasie (Cohen *et al.* 2006; Sarkar *et al.* 2008; Van Engelen *et al.* 2008). Ook leek IFN γ in lage concentraties een positieve invloed te hebben op pre- en peri-implantatie van trofoblast cellen in knaagdieren (Albieri *et al.* 2005).

Mogelijk is de verhoogde productie van IL12 na een pro-inflammatoire stimulus in het begin van de zwangerschap van belang in deze fysiologische adaptatie. Deze suggestie komt overeen met de bevindingen van Zenclussen *et al.* (2002). Deze auteurs vonden dat bij vrouwen met recidiverende miskramen minder IL12 geproduceerd werd vergeleken met een normale zwangerschap. Bovendien werd in IL12 deficiënte muizen vasculaire pathologie gezien in de uteroplacentaire interface (Croy *et al.* 1997). Gedurende het

tweede trimester van de zwangerschap zagen we in ons onderzoek het met LPS gestimuleerde percentage IL12 producerende monocytten dalen. Dit zou kunnen suggereren dat in de loop van het tweede trimester de monocytten steeds verder geactiveerd worden: het ontstaan van de zg. LPS tolerantie. Deze daling van het percentage IL12 producerende monocytten in de loop van het tweede trimester lijkt samen te gaan met het groeien van de placenta. In het derde trimester van de zwangerschap zagen wij het percentage IL12 producerende monocytten stijgen vanaf ongeveer 30 weken zwangerschapsduur. Net als bij de stijging van het percentage IL1 β producerende monocytten zou de reden van de stijging in IL12 productie ook gevonden kunnen worden in voorbereiding op de partus.

In de studies die worden beschreven in *hoofdstukken 3 en 4* hebben we dus aangetoond dat het niet-specifieke immuunsysteem tijdens de zwangerschap geactiveerd lijkt te zijn. Het is nog niet duidelijk wat het fysiologische belang is van de activatie van het ontstekingsstelsel. Het fysiologische belang van de activatie van het niet-specifieke immuunsysteem zou kunnen zijn dat het niet-specifieke immuunsysteem compenseert voor de veranderingen in het specifieke immuunsysteem, om zo een goede maternale afweer te waarborgen. Regulatoire T (Treg) cellen, die een immunosuppressieve functie hebben, zijn, zoals beschreven in *hoofdstuk 1*, in grotere aantallen aanwezig in zwangere dan in niet-zwangere individuen (Heikkinen *et al.* 2004; Sasaki *et al.* 2004; Somers *et al.* 2004). De pro-actieve staat van de monocytten zou bv. de immunosuppressieve functie van deze Treg cellen kunnen compenseren (Grohmann *et al.* 2001; Fallarino *et al.* 2003). Daarnaast zou activatie van het niet-specifieke immuunsysteem ook van belang kunnen zijn om de verschuiving van de Th1/Th2 cytokine balans richting Th2 cytokine productie te compenseren (Sacks *et al.* 1998, 1999).

De andere vraag die onbeantwoord is gebleven met de experimenten uit dit proefschrift is hoe de monocytten tijdens de zwangerschap geactiveerd worden. Er zijn in de loop van de jaren verschillende suggesties gedaan om deze vraag te kunnen beantwoorden. De heersende gedachte is dat de placenta verantwoordelijk is voor de activatie van het ontstekingsstelsel (Redman en Sargent 2005; Borzychowski *et al.* 2006). Activatie van monocytten door de placenta zou kunnen optreden door de doorstroming van monocytten door de placentaire circulatie (Mellembakken *et al.* 2002, Fest *et al.* 2007), maar ook omdat de placenta factoren produceert die in de circulatie komen. Placentaire factoren die het ontstekingsstelsel zouden kunnen activeren zijn de syncytiotrofoblast microparticles (STBM) (Germain *et al.* 2007; Redman en Sargent 2008). De trofoblast produceert ook cytokines die het ontstekingsstelsel zouden kunnen beïnvloeden, zoals IL4, IL6 en IL10 (De Moraes Pinto *et al.* 1996; Roth *et al.* 1996; Sacks *et al.* 2001). De laatste, een anti-inflammatoire cytokine, kan de productie van de pro-inflammatoire IL12, TNF α en IL1 β downreguleren (Ji *et al.* 2004; Conti *et al.* 2008). Hormonen, zoals progesteron en oestrogeen, lijken ook invloed te hebben op de activatie van monocytten (Polan *et al.* 1989; Loy *et al.* 1992).

T cellen:

Het is al enige tijd bekend dat aan type 2 gerelateerde autoimmuunziekten, zoals bv. lupus erythematosus, verergeren tijdens de zwangerschap. Aan type 1 gerelateerde autoimmuunziekten, zoals reumatoïde artritis, gaan juist vaak in remissie tijdens een normale zwangerschap (Archer 1950; Varner *et al.* 1983; Ostensen *et al.* 2002). Ook zijn zwangere individuen sneller ontvankelijk voor infecties die afhankelijk zijn van een Th2 respons, zoals infecties met nematoden (Buendia *et al.* 2002). Parasieten die een Th1 respons induceren, zoals bv. *Leishmania major*, hebben een aborterend effect (Krishnan

et al. 1996). Deze klinische observaties duiden erop dat tijdens de zwangerschap de balans in Th1/Th2 immuunresponsen verschuift in de richting van Th2 responsen. Inderdaad hebben wij in de in *hoofdstuk 2* beschreven studie gezien, dat het percentage IFN γ producerende T cellen na stimulatie in het derde trimester van de gezonde zwangerschap was verlaagd vergeleken met het percentage IFN γ producerende T cellen in niet-zwangere vrouwen. Het percentage IL2 producerende cellen veranderde niet in Tc cellen, maar was wel significant verlaagd in Th cellen. Het percentage IL4 en IL10 producerende T cellen na stimulatie veranderde niet in zwangere vrouwen vergeleken met niet-zwangere vrouwen. Hieruit kunnen we concluderen dat er in het derde trimester van een gezonde zwangerschap een verschuiving plaatsvindt van een Th1- naar een Th2 respons vergeleken met de folliculaire fase. Dit lijkt meer het gevolg te zijn van een daling in de productie van type 1 cytokines dan een verhoging in productie van type 2 cytokines.

In onze longitudinale studie (*hoofdstuk 4*) is verder onderzocht hoe de gestimuleerde type 1 en type 2 cytokine productie door lymfocyten verloopt gedurende de zwangerschap. In dit hoofdstuk hebben we de daling van het percentage IFN γ producerende T cellen in het derde trimester van de zwangerschap bevestigd. Bovendien hebben we aangetoond dat er een constante daling van het percentage IFN γ producerende lymfocyten zichtbaar is vanaf 10 tot 40 weken zwangerschapsduur, als de gehele zwangerschap vervolgd wordt. Ook de percentages IL2 producerende Th en Tc cellen leken gedaald te zijn gedurende de gehele zwangerschap. Deze bevindingen komen overeen met de theorie dat een Th1 respons ongunstig voor de zwangerschap zou zijn (o.a. Raghupathy 1997). Opvallend is dat er een negatieve correlatie lijkt tussen de daling in percentage IFN γ producerende T cellen en de hoeveelheid trofoblast. Dit suggereert dat trofoblast cellen een invloed hebben op de IFN γ productie van perifere T cellen. Dit komt overeen met de observatie dat in tweeling zwangerschappen een grotere daling van het percentage Th1 lymfocyten wordt gezien vergeleken met eenling zwangerschappen (Suzuki *et al.* 2002). De grootte van de foetal-maternale interface zou wel eens van belang kunnen zijn voor de daling in de Th1 respons. Oestrogenen en progesteron, die in steeds grotere hoeveelheden door de placenta worden geproduceerd (Piccini *et al.* 2000) of de vorming van microfragments kunnen van invloed zijn op de daling van type 1 cytokines gedurende de zwangerschap (Germain *et al.* 2007).

In overeenstemming met onze in *hoofdstuk 2* beschreven studie, veranderde het percentage IL4 producerende lymfocyten nauwelijks tijdens de zwangerschap vergeleken met niet-zwangeren. Alleen aan het eind van de zwangerschap zagen we een significante verlaging van het percentage IL4 positieve Th cellen vergeleken met niet-zwangeren. Bestudering van de loop van de zwangerschap liet zien dat het percentage IL4 producerende lymfocyten een sinus-achtige curve volgde. Dit werd zowel bij Th - als Tc cellen gezien en kwam overeen met het onderzoek van Wilke *et al.* (2006). Ook voor het percentage IL10 producerende lymfocyten gold dat er geen verschillen werden gevonden tussen zwangere - en niet-zwangere individuen. Echter, net als bij IL4, leek het percentage IL10 producerende lymfocyten niet constant gedurende de zwangerschap. Bij IL10 producerende Th en Tc cellen zagen we een sinus-achtig verloop met een maximaal percentage rond 30 weken. Deze relatieve toename van het percentage IL10 producerende lymfocyten tijdens de zwangerschap zou van belang kunnen zijn voor het behouden van de zwangerschap, omdat experimenten met knock-out IL10 muizen hebben aangetoond dat deze muizen

“abortus prone” zijn. Inderdaad resulteerde toediening van IL10 aan deze muizen in minder foetale afstoting (Chaouat *et al.* 1995). Na de piek van 30 weken zagen we in ons onderzoek weer een daling van het percentage IL10 producerende lymfocyten tot het einde van de zwangerschap. Wederom zou dit te maken kunnen hebben met de voorbereiding op de bevalling.

NK cellen:

NK cellen spelen een belangrijke rol binnen het niet-specifieke immuunsysteem. Ongeveer 5% van de perifere lymfocyten bestaat uit NK cellen die te herkennen zijn aan de expressie van CD16⁺/CD56^{dim} of CD16⁺/CD56^{bright}. Er is relatief veel bekend over de uterine NK cellen (uNK cellen) in de foetal-maternale interface, echter over de functie van perifere NK cellen in de zwangerschap is relatief weinig bekend. In onze studie beschreven in *hoofdstuk 2* hebben we gekeken naar het percentage cytokine producerende NK cellen na stimulatie in week 30 van de zwangerschap vergeleken met vrouwen in de folliculaire fase. Het aantal perifere NK cellen was gedaald tijdens de zwangerschap t.o.v. folliculaire fase. Het lijkt zo te zijn dat een percentage perifere NK cellen van boven de 18% niet overeen komt met een levend geboren kind (Beer *et al.* 1996). Dit impliceert dat een daling in de hoeveelheid NK cellen nodig is voor het behoud van een gezonde zwangerschap. In ons onderzoek was niet alleen het aantal perifere NK cellen tijdens de zwangerschap gedaald, maar ook was het percentage NK cellen dat IFN γ produceert in de zwangerschap verlaagd t.o.v. de folliculaire fase. Het percentage IL2 producerende NK cellen in het derde trimester van de zwangerschap kwam overeen met het percentage van niet-zwangere vrouwen. Ook toonde het percentage IL4 en IL10 producerende NK cellen geen verschil tussen derde trimester zwangerschap en niet-zwangere vrouwen. Net als bij Th en Tc lymfocyten zagen we in NK cellen dus een verschuiving van een Th1 respons richting een Th2 respons. Ook dit was het gevolg van een afname van de Th1 cytokine productie. Deze bevindingen komen overeen met recente bevindingen van Borzychowski *et al.* Ook deze auteurs lieten zien dat in het derde trimester van de zwangerschap het aantal type 1 NK cellen afneemt (Borzychowski *et al.* 2005).

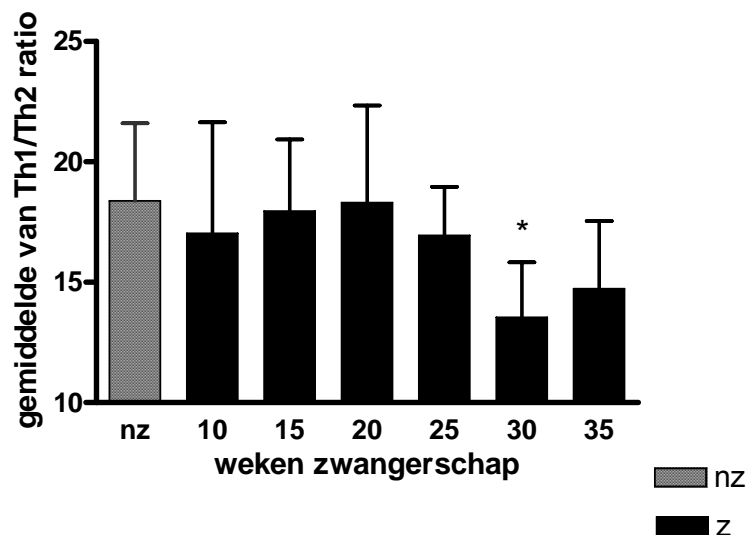
Ook voor de perifere NK cellen hebben we in onze studie die wordt beschreven in *hoofdstuk 4*, het verloop van de gestimuleerde cytokine productie gedurende de zwangerschap bestudeerd. In deze studie hebben we laten zien dat het percentage IFN γ producerende NK cellen in de loop van de zwangerschap daalt; vanaf 20 weken zwangerschapsduur was het percentage IFN γ producerende NK cellen significant gedaald vergeleken met niet-zwangere individuen. Net als bij T lymfocyten leek de daling van het percentage IFN γ producerende NK cellen gecorreleerd te zijn aan de hoeveelheid trofoblast. Hoewel er een trend zichtbaar was van een lager percentage IL2 producerende NK cellen tijdens de zwangerschap, waren er geen significante verschillen gevonden tussen zwangere en niet-zwangere individuen. In het percentage IL4 producerende NK cellen werd een daling gezien ten opzichte van het percentage bij niet-zwangere vrouwen. Opvallend was dat de IL4 curve gedurende de zwangerschap een sinus-achtig patroon liet zien, waarbij het percentage IL4 producerende NK cellen bij 30 weken een top bereikte. Hierna daalde het percentage weer en was aan het eind van de zwangerschap significant verlaagd vergeleken met niet-zwangere vrouwen. Het percentage IL10 producerende NK cellen was bij 10 weken zwangerschap significant gedaald t.o.v. het percentage in niet-zwangere vrouwen. Dit in tegenstelling tot onderzoek van Higuma-Myojo *et al.* (2005), die juist een verhoging vonden in de hoeveelheid IL10 producerende perifere NK cellen.

Daarna steeg in ons onderzoek het percentage met een golvende beweging en werd een maximum bereikt bij 30 weken zwangerschap. Echter het percentage IL10 producerende NK cellen was niet meer significant verschillend met niet-zwangere vrouwen.

Ons onderzoek toont aan dat het percentage IFN γ producerende lymfocyten en NK cellen na stimulatie gedurende de zwangerschap steeds lager wordt. Wij suggereren dat deze verandering in de balans tussen type 1 en type 2 cytokines van belang is voor een gezonde zwangerschap. Immers, een dominantie van Th1 cytokines geeft een verhoogde kans op abortus (Makhseed *et al.* 1999; Raghupathy *et al.* 1999). Daarnaast wordt beschreven dat in preeclampsie meer Th1 cytokines worden gemeten (TNF α , IFN γ , IL1 β) vergeleken met gezonde zwangere vrouwen (Kupferminc *et al.* 1994; Vince *et al.* 1995; Russel *et al.* 1997; Kaleli *et al.* 2005; Sharma *et al.* 2007; Montagnana *et al.* 2008). Dit suggereert dat een pathologische zwangerschap als preeclampsie gepaard gaat met een verschuiving naar Th1 cytokine productie en het ontstaan van een Th1/Th2 dysbalans. (Darmochwal-Kolarz *et al.* 1999, 2002; Saito *et al.* 1999b; Wilczynski *et al.* 2003; Borzychowski *et al.* 2005; Higuma-Moyojo *et al.* 2005; Jonsson *et al.* 2006; Ohkuchi *et al.* 2007; Sharma *et al.* 2007).

Naast de daling van de Th1 cytokines gedurende de zwangerschap liet ons onderzoek ook zien dat, hoewel het percentage IL4 en IL10 producerende lymfocyten en NK cellen niet sterk veranderde in zwangere vrouwen vergeleken met niet-zwangere vrouwen, het percentage IL4 en IL10 producerende lymfocyten en NK cellen toch niet constant bleef gedurende de zwangerschap. Zowel de percentages IL4 als IL10 producerende lymfocyten en NK cellen leken een sinus-achtige curve te volgen tijdens de zwangerschap met de laagste waarden tussen week 10 en week 20 van de zwangerschap en de hoogste waarden rond week 30. Dit suggereert dat de productie van deze Th2 cytokines ook tijdens de zwangerschap gereguleerd wordt en dat ze een rol spelen in een gezonde zwangerschap. Wat deze rol is, is nog onduidelijk. Uit dierexperimenteel onderzoek bleek namelijk dat bij muizen zonder maternaal IL4 of IL10 de zwangerschap zonder tekenen van pathologie verliep (Svensson *et al.* 2001). Placentair IL10 lijkt echter van groter belang. Muizen met een deficiëntie in placentaire IL10 productie bleken “abortus prone”. De gevoeligheid voor abortus kon worden opgeheven met IL10 injecties (Chaouat *et al.* 1995).

Zoals hierboven beschreven zijn niet alle Th1 fenomenen slecht voor de zwangerschap: zowel IFN γ als TNF α zijn van belang voor de implantatie en placentatie (Ostojic *et al.* 2003; Zhang *et al.* 2003; Monk *et al.* 2005). De lagere percentages IL4- en IL10 producerende lymfocyten in het begin van de zwangerschap zouden een aanpassing kunnen zijn in het belang van een goede implantatie en placentatie in deze periode van de zwangerschap. Immers, een Th2 respons kan een Th1 respons onderdrukken wat ongunstig zou kunnen zijn voor een normale implantatie en placentatie. In het begin van de zwangerschap lijkt er dus geen Th2 fenomeen te zijn. Dit wordt ook duidelijk uit figuur 1. Deze figuur toont de ratio van het percentage IFN γ /IL4 producerende T helper cellen zoals gemeten en beschreven in onze studie in hoofdstuk 4 gedurende de zwangerschap. Onze resultaten suggereren dat na week 20 van de zwangerschap, wanneer de vorming van de placenta voltooid is, van belang is dat een verschuiving van de Th1 respons richting Th2 respons optreedt: we zien een stijging in de Th2 cytokine productie en een daling in de Th1 cytokine productie en daarmee een daling van de Th1/Th2 ratio, die, berekend vanuit de resultaten van onze longitudinale studie, significant is bij 30 weken zwangerschapsduur.



Figuur 1. Gemiddelde Th1/Th2 ratio (percentage IFN γ producerende Th cellen/percentage IL4 producerende Th cellen gedurende de zwangerschap); X-as: de zwangerschapsduur in weken. * = significant vergeleken met niet-zwangeren ($P < 0,05$). nz = niet-zwangeren, z = zwangeren.

Onze resultaten lijken derhalve te suggereren dat in het begin van de zwangerschap er een Th1 respons moet zijn, terwijl aan het eind van de zwangerschap de Th1 respons juist onderdrukt moeten worden. Dit komt overeen met de eerdere suggestie van Chaouat *et al.*, die suggereerden dat de stelling “zwangerschap is een Th2 fenomeen” een oversimplificatie is van de werking van het immuunsysteem tijdens de zwangerschap, hoewel het ons wel houvast biedt voor toekomstig onderzoek (Chaouat 2007).

In preeclampsie

Zoals beschreven in ons review (*hoofdstuk 5*), kunnen verschillende vormen van preeclampsie worden onderscheiden, waarbij met name verschil gemaakt wordt tussen late onset (maternale) preeclampsie en early onset (placentaire) preeclampsie. Er wordt veel onderzoek verricht naar de early onset preeclampsie, aangezien deze groep patiënten van klinisch groot belang geacht wordt wegens het ernstige verloop van het ziektebeeld dat vroeg in de zwangerschap ontstaat (voor 34 weken). Late onset preeclampsie treedt laat op in de zwangerschap, na 34 weken, en verloopt vrij mild. Bovendien openbaart zich deze vorm van preeclampsie op een tijdstip dat het kind in principe levend geboren kan worden. Er is dan ook zelden sprake van groot gevaar voor het kind. Echter, om twee redenen is het toch interessant deze groep preeclampsie patiënten te bestuderen. In de eerste plaats omdat onderzoek naar deze vorm van preeclampsie ons ook meer inzicht kan verschaffen in de ernstige vorm van preeclampsie. In de tweede plaats omdat voor deze groep patiënten ziekenhuisopname nodig is; derhalve consumeren deze patiënten een behoorlijke hoeveelheid zorg in de Nederlandse ziekenhuizen. Daarom hebben we in dit proefschrift de immuunrespons van milde preeclampsie patiënten (late onset) vergeleken met de immuunrespons van

gezonde zwangere proefpersonen (*hoofdstuk 6*). Als maat voor het functioneren van de immuunrespons hebben we wederom gekeken naar de gestimuleerde cytokine productie van monocytten (na stimulatie met LPS), lymfocyten en NK cellen (na stimulatie met PMA en calciumionofor).

Monocytten

In onze groep van late onset preeclampsie patiënten vonden we verschillen in de cytokine productie van monocytten na stimulatie met LPS vergeleken met normale zwangeren. Dit suggereert dat monocytten activatie veranderd is in late onset preeclampsie. Hoewel we geen verschil vonden in het percentage TNF α producerende monocytten na LPS-stimulatie tussen preeclampsie patiënten en normale zwangere individuen was wel de mean channel brightness (als maat voor de hoeveelheid geproduceerd TNF α per cel) in de preeclampsie groep gedaald t.o.v. gezonde zwangere vrouwen. Deze daling kan een gevolg zijn van LPS tolerantie. Zoals eerder beschreven is LPS-tolerantie een fenomeen van geactiveerde monocytten, waarbij deze minder cytokines produceren, waaronder TNF α , na stimulatie met LPS (Munoz *et al.* 1991). Onze bevindingen komen overeen met onderzoek van Luppi en Deloia (2006), waar in een gemêleerde groep ernstige- (maar geen HELLP) en late onset preeclampsie patiënten eveneens geen verandering in het percentage TNF α producerende monocytten na LPS-stimulatie werd gezien. Deze onderzoeksgroep keek echter niet naar de mean channel brightness. Ons onderzoek lijkt ook overeen te komen met een onderzoek van Mazouni *et al.*, die bij late onset preeclampsie patiënten vaststelden dat de secretoire TNF α capaciteit van de met LPS gestimuleerde monocytten was afgenomen vergeleken met normale zwangere proefpersonen (Mazouni *et al.* 2008). Echter, Brewster *et al.* (2008), vonden geen verschil in de secretoire capaciteit van TNF α van door LPS gestimuleerde monocytten in late onset preeclampsie patiënten vergeleken met gezonde zwangere individuen. Het is moeilijk de patiënten groep van Brewster te vergelijken met onze patiënten groep, omdat Brewster *et al.* geen gegevens lieten zien over de bloeddruk en proteinurie. Mogelijk betrof het hier een groep patiënten met ernstiger preeclampsie dan onze groep en kan het verschil daardoor worden verklaard. Er zijn een tweetal studies gedaan naar LPS gestimuleerde TNF α productie in ernstige preeclampsie patiënten. De ene studie liet een verlaagde secretoire capaciteit van TNF α zien in ernstige preeclampsie patiënten vergeleken met normale zwangere individuen (Beckmann *et al.* 2004). De tweede studie liet een gelijk gebleven secretoire capaciteit van TNF α zien in gestimuleerde monocytten van ernstige preeclampsie patiënten vergeleken met normale zwangere individuen (Brewster *et al.* 2008). Hier gold echter dezelfde beperking voor de studie van Brewster als hierboven beschreven. De ernst van de preeclampsie van de patiënten in de studie van Brewster was niet goed in te schatten. Onze studie lijkt aan te tonen dat monocytten geactiveerd zijn tijdens milde preeclampsie, waardoor ze minder TNF α produceren na een LPS-stimulus vergeleken met de monocytten van normale zwangeren.

In late onset preeclampsie patiënten vonden wij geen verschil in het percentage IL1 β producerende monocytten en evenmin in de mean channel brightness vergeleken met gezonde zwangere individuen. Dit is in overeenstemming met het onderzoek van Brewster *et al.* waarin ook geen verschil werd gevonden in de secretoire capaciteit van IL1 β in late onset preeclampsie vergeleken met normale zwangere individuen (Brewster *et al.* 2008). De bevindingen van ons en van Brewster *et al.* lijken echter in tegenstelling met het onderzoek van Luppi en Deloia, die na stimulatie van vol bloed met LPS een gedaald percentage IL1 β producerende monocytten vonden in hun gemêleerde groep

preeclampsie patiënten (Luppi en Deloia 2006). Mogelijk werd de daling in het percentage IL1 β producerende monocytten in deze groep veroorzaakt door de ernstige preeclampsie patiënten en niet door de milde preeclampsie patiënten.

In de late onset preeclampsie patiënten in ons onderzoek daalde het percentage IL12 producerende monocytten na LPS-stimulatie t.o.v. gezonde zwangere individuen. Ook dit kan het gevolg zijn van LPS-tolerantie (Munoz *et al.* 1991). Onze resultaten komen niet overeen met het onderzoek van Brewster *et al.*, omdat zij geen verschil lieten zien in de gestimuleerde secrettoire capaciteit van IL12 door monocytten (Brewster *et al.* 2008). Zoals hierboven beschreven is het echter moeilijk de patiënten groep van Brewster te vergelijken met onze patiënten groep, omdat Brewster *et al.* geen gegevens lieten zien over de bloeddruk en proteinurie. Omdat IL12 een sterke stimulator is van de IFN γ productie door lymfocyten en NK cellen (Trinchieri 1993), suggereren onze data van de verlaagde IL12 productie van monocytten na LPS-stimulatie een verlaagde Th1 respons in onze groep van late onset preeclampsie patiënten.

T cellen

Ook de cytokine productie in perifere T cellen verandert in preeclampsie. Het in de literatuur beschreven onderzoek naar de cytokine productie van perifere T cellen in preeclampsie patiënten is tot nu toe voornamelijk gedaan in ernstige early onset preeclampsie patiënten (Saito *et al.* 1999a-b; Darmochwal-Kolarz *et al.* 2002; Orange *et al.* 2003). Deze studies lieten allemaal een toename in de Th1 cytokine productie zien bij patiënten met ernstige early onset preeclampsie. In de studie beschreven in *hoofdstuk 6* hebben wij in relatief milde late onset preeclampsie gekeken naar de perifere T cellen en hun percentage cytokine productie t.o.v. gezonde zwangeren. Wij vonden geen verschil in het percentage IFN γ producerende T cellen in preeclampsie patiënten vergeleken met gezonde zwangeren. In tegenstelling tot de verwachting, was het percentage IL2 producerende Th cellen wel significant gedaald t.o.v. normale zwangere vrouwen. Eveneens in tegenstelling tot de verwachting liet onze studie een significante stijging zien in het percentage IL4 producerende Tc cellen. In milde late onset preeclampsie werd geen significant verschil gezien in het percentage IL10 producerende Th en Tc cellen t.o.v. normale zwangeren. Tezamen met onze bevindingen van monocyte cytokine productie, laat dit zien dat in onze populatie milde preeclampsie patiënten, in tegenstelling tot ernstige early onset preeclampsie patiënten, een relatieve Th2 dominantie aanwezig lijkt te zijn.

NK cellen

De verandering in cytokine productie van perifere NK cellen in late onset preeclampsie patiënten is nog niet eerder onderzocht. In *hoofdstuk 6* is het percentage cytokine producerende NK cellen beschreven in late onset preeclampsie t.o.v. de normale zwangerschap. In tegenstelling tot de in de literatuur beschreven bevindingen over early onset preeclampsie is de hoeveelheid NK cellen in late onset preeclampsia gedaald t.o.v. de hoeveelheid in een normale zwangerschap (Borzychowski *et al.* 2005). Daarnaast werd in onze groep preeclampsie patiënten geen verschil gezien in het percentage IFN γ producerende NK cellen vergeleken met gezonde zwangeren (*hoofdstuk 6*). Dit was in tegenstelling tot de groep ernstiger preeclampsie patiënten waarbij een verhoogd percentage IFN γ producerende perifere NK cellen werd gevonden (Darmochwal-Kolarz *et al.* 2002). Ook in het percentage IL2, IL4 en IL10 producerende NK cellen werd geen verschil gevonden tussen onze preeclampsie groep en normale zwangere vrouwen. Deze resultaten lijken te suggereren dat NK cellen in

late onset preeclampsie de cytokine productie niet veranderen vergeleken met NK cellen in een normale zwangerschap. Dit suggereert dat de perifere NK cellen geen veranderende functie hebben in late onset preeclampsie.

Bovenstaande bevindingen sluiten aan bij de gedachte dat milde en ernstige preeclampsie verschillende etiologie en pathofysiologie hebben. Terwijl milde preeclampsie gepaard lijkt te gaan met een verschuiving richting een Th2 immuunrespons en activatie van de niet-specifieke immuunrespons, lijkt ernstige preeclampsie gepaard te gaan met een verschuiving richting een Th1 immuunrespons tezamen met de activatie van de niet-specifieke immuunrespons. Dierexperimenteel onderzoek heeft tevens laten zien dat de pathogenese van ernstige en milde preeclampsie van elkaar verschillen. Symptomen van preeclampsie kunnen worden opgewekt in een zwanger- muis- model door adoptieve transfer van splenocyten gestimuleerd met IL12 of met IL4. Hoewel beide groepen zwangere muizen preeclampsie-achtige verschijnselen kregen, ontwikkelde de groep muizen die splenocyten gestimuleerd met IL4 toegediend hadden gekregen minder ernstige symptomen dan de groep die splenocyten gestimuleerd met IL12 toegediend hadden gekregen (Hayakawa *et al.* 2000). Dit suggereert, samen met onze bevindingen, dat niet alleen de dominantie van een type 1 respons preeclampsie kan induceren, maar dat ook een dominantie van een type 2 respons preeclampsie lijkt te kunnen induceren, zij het in een mildere vorm. Er zijn weinig studies verricht die milde en ernstige preeclampsie rechtstreeks met elkaar vergelijken. Deze studies keken o.a. naar serum concentraties van verschillende cytokines of naar de secretoire capaciteit van cellen (Borekci *et al.* 2007; Sharma *et al.* 2007; Brewster *et al.* 2008). Serum TNF α concentraties van milde preeclampsie patiënten waren significant gestegen vergeleken met de serum concentratie van TNF α in normale zwangere vrouwen. Serum TNF α concentraties van ernstige preeclampsie patiënten waren weer significant toegenomen vergeleken met de meting in milde preeclamptische vrouwen (Sharma *et al.* 2007). Ook serum IL6 was hoger bij patiënten met ernstige preeclampsie vergeleken met patiënten met milde preeclampsie (Sharma *et al.* 2007). Er werd echter geen verschil gevonden in serum IL10 concentraties tussen milde en ernstige preeclampsie patiënten (Borekci *et al.* 2007). Er is één studie die de secretoire capaciteit van monocyten na LPS-stimulatie heeft onderzocht in late onset preeclampsie versus early onset preeclampsie (Brewster *et al.* 2008). In dit onderzoek van Brewster *et al.* werden geen significante verschillen aangetroffen in secretoire capaciteit van verschillende cytokines tussen milde en ernstige preeclampsie patiënten en tussen preeclampsie patiënten (zowel late onset als early onset) en normale zwangeren. De totale inflammatoire respons liet echter wel verschillen zien tussen late onset en early onset preeclampsie (Brewster *et al.* 2008). De inflammatoire respons in late onset preeclampsie was toegenomen, terwijl de inflammatoire respons in early onset preeclampsie was afgenomen (Brewster *et al.* 2008). Tezamen met onze gegevens duiden bovenstaande gegevens op een verschil in immuunrespons tussen milde en ernstige preeclampsie.

De vraag rijst hoe het komt dat de dominantie van type 2 cytokines preeclamptische kenmerken kan geven. Een mild preeclampsie-achtig syndroom kon ook opgewekt worden in een zwangere rat na de activatie van de ontstekingsrespons met behulp van infusie van een lage dosis LPS (Faas *et al.* 1994). Deze studie suggereerde dat alleen een activatie van de ontstekingsrespons voldoende zou zijn om een preeclampsie-achtig beeld op te wekken. Deze hypothese verklaart nog niet de rol van de Th2 respons in milde preeclampsie. Verschillende studies hebben echter laten zien dat een type 2

cytokine dominantie de ontstekingsrespons zou kunnen versterken (Tokoro *et al.* 1997; Infante-duarte *et al.* 1999; McGuirk *et al.* 2002; Shimojo *et al.* 2008). Dit zou kunnen suggereren dat activatie van de ontstekingsrespons voldoende is om een milde preeclampsie te induceren en dat de versterkte Th2 respons de ontstekingsrespons verergert en in stand houdt.

Bovenstaande suggesties leiden tot de volgende vraag: bij welke zwangere individuen treedt een extra activatie op van het ontstekingssysteem? Zowel diabetes patiënten als obese individuen hebben een verhoogde kans op milde preeclampsie (Siddiqi *et al.* 1991; Rosenn *et al.* 1993). Opvallend is dat bij beide patiënten groepen het ontstekingssysteem is geactiveerd (Hotamisligil *et al.* 1993,1995; Mohamed-ali *et al.* 1997; Wolf *et al.* 2001). Mogelijk blijft deze verhoogde activatie gedurende de hele zwangerschap aanwezig, wat uiteindelijk resulteert in een milde preeclampsie aan het eind van de zwangerschap. Recentelijk zijn de resultaten van een aantal onderzoeken gepubliceerd waarin een relatie tussen preeclampsie en paradontitis werd aangetoond (Bogges *et al.* 2003; Kunnen *et al.* 2007). Bij deze patiënten wordt mogelijk het ontstekingssysteem geactiveerd door LPS vormende Gram-negatieve bacteriën. Een andere activatie van het ontstekingsysteem die zou kunnen leiden tot preeclampsie is een virusinfectie. Een virusinfectie kan het ontstekingssysteem activeren (Galiana –Arnoux en Imler 2006; Severa en Fitzgerald 2007). De gedachte dat een virusinfectie preeclampsie zou kunnen induceren komt voort uit de bevinding dat late onset preeclampsie seizoens gebonden lijkt te zijn, waarbij preeclampsie in de wintermaanden significant meer voorkomt dan in de zomermaanden (Magnu en Eskild 2001; Immink *et al.* 2008; Tam *et al.* 2008), terwijl het risico op een virale besmetting ook in de wintermaanden hoger is (Thomson *et al.* 2003).

Toekomstig onderzoek

In dit proefschrift hebben we ons gefocust op het beloop van de immuunrespons in zowel het specifieke als het niet specifieke perifere immuunsysteem in niet-zwangere-, normale zwangere –en preeclamptische vrouwen. Zoals beschreven in dit proefschrift, lijkt in het begin van een normale zwangerschap een Th1 respons te domineren, terwijl vanaf 20 weken, de balans tussen de Th1/Th2 respons verschoven wordt in de richting van de Th2 respons. Ook blijkt het niet-specifieke immuunsysteem in geactiveerde staat te zijn. In late onset, milde preeclampsie patiënten lijkt dit Th2 fenomeen aan het eind van de zwangerschap nog meer uitgesproken en is het niet-specifieke immuunsysteem nog meer geactiveerd. Voor toekomstig onderzoek blijft de vraagstelling: waarom is in een zwangerschap het niet-specifieke systeem geactiveerd? En waarom is de zwangerschap een Th2 fenomeen, dat in milde preeclampsie nog meer uitgesproken is? Zoals beschreven in de literatuur lijkt milde preeclampsie een ander ziektebeeld dan ernstige preeclampsie: wij hebben in dit proefschrift aangetoond dat er verschillen zijn tussen ernstige en milde preeclampsie in de immuunrespons. De vraag rijst: wat is de verklaring van deze immunologische verschillen? Om op deze vragen antwoord te kunnen geven is het interessant om in de toekomst de interactie tussen de verschillende cytokines van het niet-specifieke en het specifieke immuunsysteem nader te bekijken. Milde preeclampsie zou meer gebaseerd kunnen zijn op een extra ontstekingsstimulus in de vorm van een stimulus door een onderliggend ziektebeeld als adipositas, diabetes of evt. een virus. Daarentegen lijkt ernstige preeclampsie, een Th1 fenomeen, gebaseerd op een placentair probleem en kan een genetische predispositie hebben (Daher *et al.* 2006; Saarela *et al.* 2006). Zoals boven

beschreven lijkt de Th1/Th2 theorie te simpel en lijkt onderzoek naar individuele cytokines te kort te schieten om de immunologische reactie van preeclampsie te achterhalen. Nieuwe technieken als multiple bead array systems, waarmee verschillende cytokines en hun relatie tegelijkertijd getest kunnen worden, zouden hier nog meer inzicht in kunnen bieden (De Jager en Rijkers 2006; Brewster *et al.* 2008). Ook verfijnde secretie assays, die nog lagere concentraties kunnen meten, kunnen meer inzicht bieden in cytokine productie in de toekomst (Assenmacher *et al.* 2002). Ook de rol van het niet-specifieke immuunsysteem in de placenta en de samenhang met perifere immuuncellen in het bloed en hun receptoren (pattern recognition receptors (PRR), waaronder TLR, mannose receptors, NOD-like receptors en secretore PRRs) zal in de toekomst meer moeten worden uitgediept. Ook de werking en de functie van het complementsysteem in de zwangerschap en de samenwerking met het niet-specifieke immuunsysteem moet worden onderzocht. Verder zou met name het verschil in de placentaimmunologie tussen milde (normale placentatie) en ernstige preeclampsie (pathologische placentatie, bv. malformatie van spiraalarteriën en trofoblast invasie) meer informatie kunnen geven over de verschillen in het ontstaan van deze twee ziektebeelden. Gedacht kan worden aan onderzoek naar het verschil in placentaire cytokines, placentaire apoptosis of necrose en het verschil in hoeveelheden en functie van bv. Treg en NKreg cellen. Ook het onderzoek naar een immuunrespons bij multiparae, die in de eerste zwangerschap preeclampsie hadden en in een volgende zwangerschap geen tekenen van hypertensieve ziekten vertonen, vereist uitdieping. Ontstaat bij deze patiënten in de zwangerschap een soort immunotolerantie, waarbij de moeder niet reageert met haar immuunsysteem op stimuli? Of er ontstaat er een versnelde immuun reactie (een soort geheugenfunctie), waardoor de stimulus wordt vernietigd en er geen preeclampsie kan ontstaan?

Onderzoek naar preventie van preeclampsie zal in de toekomst een belangrijk rol moeten spelen. Gedacht moet worden aan onderzoek naar vroege markers voor preeclampsie. Van vroege, met name serummarkers, wordt gedacht dat ze een functie hebben in het ontstaan van preeclampsie door hun invloed in inadequate trofoblast migratie en implantatie. Voorbeelden van deze markers zijn o.a. urokinase type plasminogen activator (uPA)/uPA receptor (uPAR)/uPA inhibitors (PAI-1, 2) system, insulin like growth factor-binding protein (IGFBP)-1, en transforming growth factor (TGF) (Clausen *et al.* 2002; Chappell *et al.* 2002; Hietala *et al.* 2002; Anim-Nyame *et al.* 2003). Bij veranderingen in de expressie van deze markers zou preeclampsie te voorspellen zijn en zouden risicopatiënten beter gevolgd kunnen worden in de zwangerschap. Op te merken valt dat deze 'vroege markers' in het tweede trimester van de zwangerschap getest zijn, dus wel voor het ontstaan van de klinische kenmerken van preeclampsie, maar niet voor het moment dat eventueel het ontstaan van preeclampsie nog kan worden voorkomen. Onderzoek naar pre-conceptionele- en eerste trimester markers voor preeclampsie, zou in de toekomst morbiditeit en mortaliteit voor een deel kunnen voorkomen door nauwere zwangerschapscontroles en eerder klinisch handelen. Onder andere van vrouwen met een pre-conceptionele insulineresistentie is bekend dat ze een verhoogde kans hebben op het ontwikkelen van preeclampsie (Negrato *et al.* 2008). Wellicht kan onderzoek hiernaar bijdragen aan toekomstige mogelijkheden tot preventie. Omdat slechts een klein gedeelte van de zwangere populatie preeclampsie ontwikkelt, kan het verstandig zijn een bloed-sample bank op te richten van alle preeclampsie patiënten. Toekomstige nieuwe technieken kunnen dan bloedmonsters met terugwerkende kracht testen in de hoop zo meer inzicht te krijgen in de immunologische achtergrond en de algehele oorzaak van preeclampsie.

Toekomst gericht op de kliniek

Zoals het bovengenoemde stuk beschrijft, lijkt het erop dat milde en ernstige preeclampsie twee verschillende ziektebeelden te zijn, waarbij ernstige preeclampsie zijn oorspong heeft in het placentaire gedeelte en milde preeclampsie in het maternale gedeelte. In de kliniek is met name het vroeg stellen van de juiste diagnose van belang, om mortaliteit en morbiditeit van moeder en foetus te voorkomen. Toekomstig onderzoek dat van klinisch belang is, zal meer gericht moeten zijn op de preventie van het ziektebeeld of het terugdringen van verergering ervan, waardoor partus kan worden uitgesteld en maternale risico's kunnen worden verkleind. De vraag blijft: is preventie mogelijk? Mogelijk kunnen oplossingen worden gezocht in de immunotherapie. Voor de milde preeclampsiegroep zal de extra stimulus die de ontstekingsreactie geeft en daarmee preeclamptische kenmerken, moeten worden teruggedrongen. Onderzoek naar de oorzaak van deze stimulus staat voorop. De resultaten van studies die nu verricht worden naar de ontwikkeling van diabetes en adipositas lijken dan ook van belang voor toekomstig onderzoek naar milde preeclampsie.

Daarnaast is bekend dat patiënten die in het verleden milde of ernstige preeclampsie hebben gehad, op latere leeftijd een grotere kans hebben op het ontwikkelen van hypertensie, diabetes mellites en hart- en vaatziekten (Madsen *et al.* 1973; Irgens *et al.* 2001; Kestenbaum *et al.* 2003; Libby *et al.* 2007; Gaugler-Senden *et al.* 2008; Diehl *et al.* 2008). Omdat tegenwoordig de bevolking meer adipeus is dan vroeger (Kimm *et al.* 2001), moet dit van invloed zijn op de toekomstige volksgezondheid en zeker op de prevalentie van preeclampsie (Bodnar *et al.* 2005). Van toekomstig klinisch belang verder dat, met name in Nederland, vrouwen op latere leeftijd hun eerste kind krijgen. Het is bekend dat de kans op preeclampsie met de jaren stijgt (Lie *et al.* 1998; Delbaere *et al.* 2007). Immunologisch onderzoek naar preeclampsie bij oudere moeders vergeleken met jonge moeders kan meer inzichten opleveren over de immunologische achtergrond van preeclampsie.

Concluderend lijkt een klinische oplossing voor de preventie van preeclampsie nog niet makkelijk en snel voorhanden. Het ontstaan van preeclampsie lijkt multifactorieel, waarbij immunologische veranderingen in de normale zwangerschap van groot belang zijn. In de praktijk is vooralsnog alleen pre-conceptionele voorlichting voor het terugdringen van de kans op preeclampsie uitvoerbaar. Voorlichting over diabetes, adipositas en de leeftijd waarop vrouwen hun eerste kind baren, lijkt een belangrijke factor te zijn in de preventie van preeclampsie, aangezien een therapeutikum vooralsnog niet voorhanden is. Terugkijkend op ons onderzoek in dit proefschrift beschreven is er een stap voorwaarts gemaakt in het onderzoek naar late-onset preeclampsie. Het bepalen bij zwangeren van een immunologische marker vroeg in de zwangerschap, die late onset preeclampsie kan voorspellen is nog niet haalbaar, maar in de toekomst niet onmogelijk.

Referenties

- Albieri A, Hoshida MS, Gagioti SM, Lanza EC, Abrahamsohn I, Croy A, Ashkar AA, Bevilacqua E (2005) Interferon-gamma alters the phagocytic activity of the mouse trophoblast. *Reprod Biol Endocrinol.* 3, 34
- Amoudruz P, Minang JT, Sundström Y, Nilsson C, Lilja G, Troye-Blomberg M, Sverremark-Ekström E (2006) Pregnancy, but not the allergic status, influences spontaneous and induced interleukin-1beta (IL-1beta), IL-6, IL-10 and IL-12 responses. *Immunology* 119, 18-26
- Anim-Nyame N, Hills FA, Sooranna SR, Steer PJ, Johnson MJ (2003) The relationship between insulin and insulin-like growth factor binding protein-1 is modified by pre-eclampsia. *Gynecol Endocrinol.* 17, 471-476.
- Archer BH (1950) Rheumatoid arthritis treated with massive doses of human chorionic hormone to produce "pseudopregnancy". *N Y State J Med.* 50, 1265-1266
- Ashkar AA, Black GP, Wei Q, He H, Liang L, Head JR, Croy BA (2003) Assessment of requirements for IL-15 and IFN regulatory factors in uterine NK cell differentiation and function during pregnancy. *J Immunol.* 171, 2937-2944.
- Assenmacher M, Löhning M, Radbruch A (2002) Detection and isolation of cytokine secreting cells using the cytometric cytokine secretion assay. *Curr Protoc Immunol.* Chapter 6: Unit 6.27.
- Beckmann I, Efrain SB, Vervoort M, Visser W, Wallenburg HC (2004) Tumor necrosis factor-alpha in whole blood cultures of preeclamptic patients and healthy pregnant and nonpregnant women. *Hypertens Pregnancy* 23, 319-329.
- Beer AE, Kwak JY, Ruiz JE (1996) Immunophenotypic profiles of peripheral blood lymphocytes in women with recurrent pregnancy losses and in infertile women with multiple failed in vitro fertilization cycles. *Am J Reprod Immunol.* 35, 376-382.
- Bodnar LM, Ness RB, Markovic N, Roberts JM (2005) The risk of preeclampsia rises with increasing prepregnancy body mass index. *Ann Epidemiol.* 15, 475-482.
- Boggess KA, Lief S, Murtha AP, Moss K, Beck J, Offenbacher S (2003) Maternal periodontal disease is associated with an increased risk for preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 101, 227-231.
- Borekci B, Aksoy H, Al RA, Demircan B, Kadanali S (2007) Maternal serum interleukin-10, interleukin-2 and interleukin-6 in pre-eclampsia and eclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 58, 56-64.
- Borzychowski AM, Croy BA, Chan WL, Redman CW, Sargent IL (2005) Changes in systemic type 1 and type 2 immunity in normal pregnancy and pre-eclampsia may be mediated by natural killer cells. *Eur J Immunol.* 35, 3054-3063.
- Borzychowski AM, Sargent IL, Redman CW (2006) Inflammation and pre-eclampsia. *Semin Fetal Neonatal Med.* 11, 309-316
- Bouman A, Moes H, Heineman MJ, De Leij LFMH, Faas MM (2001) The immune response during the luteal phase of the ovarian cycle: increasing sensitivity of human monocytes to endotoxin. *Fertil Steril.* 76, 555-559.
- Brillard E, Pallandre JR, Chalmers D, Ryffel B, Radlovic A, Seilles E, Rohrlach PS, Pivot X, Tiberghien P, Saas P, Borg C (2007) Natural killer cells prevent CD28-mediated Foxp3 transcription in CD4+CD25- T lymphocytes. *Exp Hematol.* 35, 416-425.

- Brewster JA, Orsi NM, Gopichandran N, McShane P, Ekbote UV, Walker JJ (2008) Gestational effects on host inflammatory response in normal and pre-eclamptic pregnancies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 140, 21-26.
- Brunda MJ (1994) Interleukin-12. *J Leukoc Biol.* 55, 280-288.
- Buendía A, Fallon PG, Del Rio L, Ortega N, Caro MR, Gallego MC, Salinas J (2002) Previous infection with the nematode *Nippostrongylus brasiliensis* alters the immune specific response against *Chlamydomydia abortus* infection. *Microb Pathog.* 33, 7-15.
- Chaouat G, Assal-Meliani A, Martal J, Raghupathy R, Elliot J, Mosmann T, Wegmann TG (1995) IL10 prevents naturally occurring fetal loss in th CBA (DBA/2) mating combination and local defect in IL10 production in this abortion-prone combination is ocured by invivo injection of IFN-tau. *J Immunol.* 154, 4261-4268.
- Chaouat G (2007) The Th1/Th2 paradigm: still important in pregnancy? *Semin Immunopathol.* 29, 95-113
- Chappell LC, Seed PT, Kelly FJ, Briley A, Hunt BJ, Charnock-Jones DS, Mallet A & Poston L (2002) A longitudinal study of biochemical variables in women at risk of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 187, 127-136.
- Clausen T, Djurovic S, Reseland JE, Berg K, Drevon CA & Henriksen T (2002) Altered plasma concentrations of leptin, transforming growth factor-beta(1) and plasminogen activator inhibitor type 2 at 18 weeks of gestation in women destined to develop preeclampsia. circulating markers of disturbed placentation? *Placenta* 23, 380-385.
- Cohen M, Meisser A, Haenggeli L, Bischof P (2006) Involvement of MAPK pathway in TNF-alpha-induced MMP-9 expression in human trophoblastic cells. *Mol Hum Reprod.* 12, 225-232.
- Conti L, Cardone M, Varano B, Puddu P, Belardelli F, Gessani S (2008) Role of the cytokine environment and cytokine receptor expression on the generation of functionally distinct dendritic cells from human monocytes. *Eur J Immunol.* 38, 750-762.
- Croy BA, Ashkar AA, Foster RA, DiSanto JP, Magram J, Carson D, Gendler SJ, Grusby MJ, Wagner N, Muller W, Guimond MJ (1997) Histological studies of gene-ablated mice support important functional roles for natural killer cells in the uterus during pregnancy. *J Reprod Immunol.* 35, 111-333.
- Daher S, Sass N, Oliveira LG, Mattar R (2006) Cytokine genotyping in preeclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 55, 130-135.
- Darmochwal-Kolarz D, Leszczynska-Gorzelark B, Rolinski J, Oleszczuk J (1999) T helper 1- and T helper 2 type cytokine imbalance in pregnant women with preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 86, 165-170.
- Darmochwal-Kolarz D, Rolinski J, Leszczynska-Goarzelak B, Oleszczuk J (2002) The expressions of intracellular cytokines in the lymphocytes of preeclamptic patients. *Am J Reprod Immunol.* 48, 381-386.
- De Jager W, Rijkers GT (2006) Solid-phase and bead-based cytokine immunoassay: a comparison. *Methods* 38, 294-303.
- Delbaere I, Verstraelen H, Goetgeluk S, Martens G, De Backer G, Temmerman M (2007) Pregnancy outcome in primiparae of advanced maternal age. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 135, 41-46.
- De Moraes Pinto, MI, Vince, GS, Flanagan, BF, Hart, CA, Johnson, PM (1996) Localization of IL-4 and IL-4 receptors in the human term placenta, decidua and amniochorionic membranes. *Immunology* 90, 87-94.
- Diehl CL, Brost BC, Hogan MC, Elesber AA, Offord KP, Turner ST, Garovic VD (2008) Preeclampsia as a risk factor for cardiovascular disease later in life: validation of a preeclampsia questionnaire. *Am J Obstet Gynecol.* 198, e11-13.

- Egarter CH, Husslein P (1992) Biochemistry of myometrial contractility. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol.* 6, 755-769.
- Elenkov IJ, Wilder RL, Bakalov VK, Link AA, Dimitrov MA, Fisher S, Crane M, Kanik KS, Chrousos GP (2001) IL-12, TNF- α , and hormonal changes during late pregnancy and early postpartum: implications for autoimmune disease activity during these times. *J Clin Endocrinol Metab.* 86, 4933-4938.
- Faas MM, Schuiling GA, Baller JF, Visscher CA, Bakker WW (1994) A new animal model for human preeclampsia: ultra-low-dose endotoxin infusion in pregnant rats. *Am J Obstet Gynecol.* 171, 158-164.
- Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, Belladonna ML, Fioretti MC, Alegre ML and Puccetti P (2003) Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol.* 4, 1206-1212.
- Fest S, Aldo PB, Abrahams VM, Visintin I, Alvero A, Chen R, Chavez SL, Romero R, Mor G (2007) Trophoblast-macrophage interactions: a regulatory network for the protection of pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 57, 55-66.
- Galiana-Arnoux D, Imler JL (2006) Toll-like receptors and innate antiviral immunity. *Tissue Antigens* 67, 267-276.
- Gaugler-Senden IP, Berends AL, De Groot CJ, Steegers EA (2008) Severe, very early onset preeclampsia: Subsequent pregnancies and future parental cardiovascular health. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 140, 171-177.
- Germain SJ, Sacks GP, Sooranna SR, Sargent IL, Redman CW (2007) Systemic inflammatory priming in normal pregnancy and preeclampsia: the role of circulating syncytiotrophoblast microparticles. *J Immunol.* 178, 5949-5956.
- Grohmann U, Fallarino F, Bianchi R, Belladonna ML, Vacca C, Orabona C, Uyttenhove C, Fioretti MC, Puccetti P (2001) IL-6 inhibits the tolerogenic function of CD8 α ⁺ dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Immunol.* 167, 708-714.
- Hayakawa S, Fujikawa T, Fukuoka H, Chisima F, Karasaki-Suzuki M, Ohkoshi E, Ohi H, Kiyoshi Fujii T, Tochigi M, Satoh K, Shimizu T, Nishinarita S, Nemoto N, Sakurai I (2000) Murine fetal resorption and experimental pre-eclampsia are induced by both excessive Th1 and Th2 activation. *J Reprod Immunol.* 47, 121-138.
- Heikkinen J, Möttönen M, Alanen A, Lassila O (2004) Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua. *Clin Exp Immunol.* 136, 373-378.
- Hering L, Herse F, Verlohren S, Park JK, Wellner M, Qadri F, Pijnenborg R, Staff AC, Huppertz B, Muller DN, Luft FC, Dechend R (2008) Trophoblasts reduce the vascular smooth muscle cell proatherogenic response. *Hypertension* 51, 554-559.
- Hietala R, Pohja-Nylander P, Rutanen EM, Laatikainen T (2002) Serum insulin-like growth factor binding protein-1 at 16 weeks and subsequent preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 95, 185-189.
- Higuma-Myojo S, Sasaki Y, Miyazaki S, Sakai M, Siozaki A, Miwa N, Saito S (2005) Cytokine profile of natural killer cells in early human pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 54, 21-29.
- Hill JA, Polgar K, Anderson DJ (1995) T-helper 1-type immunity to trophoblast in women with recurrent spontaneous abortion. *JAMA.* 273, 1933-1936.
- Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM (1993) Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259, 87-91.
- Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM (1995) Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest.* 95, 2409-2415.

- Immink A, Scherjon S, Wolterbeek R, Steyn DW (2008) Seasonal influence on the admittance of pre-eclampsia patients in Tygerberg Hospital. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 87, 36-42.
- Infante-Duarte C, Kamradt T (1999) Th1/Th2 balance in infection. *Springer Semin Immunopathol.* 21, 317-338.
- Irgens HU, Reisaeter L, Irgens LM, Lie RT (2001) Long term mortality of mothers and fathers after pre-eclampsia: population based cohort study. *BMJ.* 323, 1213-1217.
- Jana B, Kozłowska A, Andronowska A, Jedlińska-Krakowska M (2008) The effect of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interleukin (IL)-1 beta and IL-6 on chorioamnion secretion of prostaglandins (PG)F 2 alpha and E2 in pigs. *Reprod Biol.* 8, 57-68.
- Ji XH, Yao T, Qin JC, Wang SK, Wang HJ, Yao K (2004) Interaction between M-CSF and IL-10 on productions of IL-12 and IL-18 and expressions of CD14, CD23, and CD64 by human monocytes. *Acta Pharmacol Sin.* 25, 1361-1365.
- Jonsson Y, Rubèr M, Matthiesen L, Berg G, Nieminen K, Sharma S, Ernerudh J, Ekerfelt C (2006) Cytokine mapping of sera from women with preeclampsia and normal pregnancies. *J Reprod Immunol.* 70, 83-91.
- Kaleli I, Kaleli B, Demir M, Yildirim B, Cevahir N, Demir S (2005) Serum levels of neopterin and interleukin-2 receptor in women with severe preeclampsia. *J Clin Lab Anal.* 19, 36-39.
- Kestenbaum B, Seliger SL, Easterling TR, Gillen DL, Critchlow CW, Stehman-Breen CO, Schwartz SM (2003) Cardiovascular and thromboembolic events following hypertensive pregnancy. *Am J Kidney Dis.* 42, 982-989.
- Kimm SY, Barton BA, Obarzanek E, McMahon RP, Sabry ZI, Wacławski MA, Schreiber GB, Morrison JA, Similo S, Daniels SR (2001) Racial divergence in adiposity during adolescence: The NHLBI Growth and Health Study. *Pediatrics* 107, E34.
- Krishnan L, Guilbert LJ, Russell AS, Wegmann TG, Mosmann TR, Belosevic M (1996) Pregnancy impairs resistance of C57BL/6 mice to Leishmania major infection and causes decreased antigen-specific IFN-gamma response and increased production of T helper 2 cytokines. *J Immunol.* 156, 644-652.
- Kunnen A, Blaauw J, Van Doormaal JJ, Van Pampus MG, Van der Schans CP, Aarnoudse JG, Van Winkelhoff AJ, Abbas F (2007) Women with a recent history of early-onset pre-eclampsia have a worse periodontal condition. *J Clin Periodontol.* 34, 202-207.
- Kupfermine MJ, Peaceman AM, Wigton TR, Rehnberg KA, Socol ML (1994) Tumor necrosis factor-alpha is elevated in plasma and amniotic fluid of patients with severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 170, 1752-1757.
- Libby G, Murphy DJ, McEwan NF, Greene SA, Forsyth JS, Chien PW, Morris AD; for the DARTS/MEMO Collaboration (2007) Pre-eclampsia and the later development of type 2 diabetes in mothers and their children: an intergenerational study from the Walker cohort. *Diabetologia* 50, 523-530.
- Lie RT, Rasmussen S, Brunborg H, Gjessing HK, Lie-Nielsen E, Irgens LM (1998) Fetal and maternal contributions to risk of preeclampsia: population based study. *BMJ.* 316, 1343-1347.
- Loy RA, Loukides JA, Polan ML (1992) Ovarian steroids modulate human monocyte tumor necrosis factor alpha messenger ribonucleic acid levels in cultured human peripheral monocytes. *Fertil Steril.* 58, 733-739.
- Luppi P, Deloia JA (2006) Monocytes of preeclamptic women spontaneously synthesize pro-inflammatory cytokines. *Clin Immunol.* 118, 268-275.

- Madsen SN, Hindberg I, Molsted-Pedersen L (1973) Insulin response to oral glucose in patients with preeclampsia. *Dan Med Bull.* 20, 13-15.
- Magnu P, Eskild A (2001) Seasonal variation in the occurrence of pre-eclampsia. *BJOG.* 108, 1116-1119.
- Makhseed M, Raghupathy R, Azizieh F, Al Azemi MM, Hassan NA, Bandar A (1999) Mitogen-induced cytokine responses of maternal peripheral blood lymphocytes indicate a differential Th-type bias in normal pregnancy and pregnancy failure. *Am J Reprod Immunol.* 42, 273-281.
- Mazouni C, Capo C, Ledu R, Honstetter A, Agostini A, Capelle M, Mege JL, Bretelle F (2008) Preeclampsia: impaired inflammatory response mediated by Toll-like receptors. *J Reprod Immunol.* 78, 80-83.
- McGuirk P, Mills KH (2002) Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases. *Trends Immunol.* 23, 450-455.
- Mellembakken JR, Aukrust P, Olafsen MK, Ueland T, Hestdal K, Videm V (2002) Activation of leukocytes during the uteroplacental passage in preeclampsia. *Hypertension* 39, 155-160.
- Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A (1997) Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor- α , in vivo. *J Clin Endocrinol Metab.* 82, 4196-4200.
- Monk JM, Leonard S, McBey BA, Croy BA (2005) Induction of murine spiral artery modification by recombinant human interferon- γ . *Placenta* 26, 835-838.
- Montagnana M, Lippi G, Albiero A, Salvagno GL, Franchi M, Guidi GC (2008) Serum pro-inflammatory cytokines in physiological and pre-eclamptic pregnancies. *Gynecol Endocrinol.* 24, 113-116.
- Mosmann TR, Sad S (1996) The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today.* 17, 138-146.
- Munoz C, Carlet J, Fitting C, Misset B, Bleriot JP, Cavaillon JM (1991) Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J Clin Invest.* 88, 1747-1754.
- Naccasha N, Gervasi MT, Chaiworapongsa T (2001) Phenotypical and metabolic characteristics of monocytes and granulocytes in normal pregnancy and maternal infection. *Am J Obstet Gynecol.* 185, 1118-1123.
- Negrato CA, Jovanovic L, Tambascia MA, Geloneze B, Dias A, De Mattos Paranhos Calderon I, Rudge MV (2008) Association Between Insulin Resistance, Glucose Intolerance, and Hypertension in Pregnancy. *Metab Syndr Relat Disord.* 11.
- Ohkuchi A, Hirashima C, Matsubara S, Suzuki H, Takahashi K, Arai F, Watanabe T, Kario K, Suzuki M (2007) Alterations in placental growth factor levels before and after the onset of preeclampsia are more pronounced in women with early onset severe preeclampsia. *Hypertens Res.* 30, 151-159.
- Orange S, Horvath J, Hennessy A (2003) Preeclampsia is associated with a reduced interleukin-10 production from peripheral blood mononuclear cells. *Hypertens Pregnancy* 22, 1-8.
- Ostensen M, Skomsvoll JF (2002) Perinatal outcome of pregnancies in women with connective tissue disease. *Lupus* 11, 661.
- Ostojic S, Dubanchet S, Chaouat G, Abdelkarim M, Truyens C, Capron F (2003) Demonstration of the presence of IL-16, IL-17 and IL-18 at the murine fetomaternal interface during murine pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 49, 101-112.

- Peraçoli JC, Rudge MV, Peraçoli MT (2007) Tumor necrosis factor- α in gestation and puerperium of women with gestational hypertension and pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 57, 177-185
- Piccinni MP, Maggi E, Romagnani S (2000) Role of hormone-controlled T-cell cytokines in the maintenance of pregnancy. *Biochem Soc Trans.* 28, 212-215.
- Polan M, Loukides JA, Nelson K (1989) Progesterone and estradiol modulate Interleukin-1 β messenger ribonucleic acid levels in cultured human peripheral monocytes. *J Clin Endocrinol Metabol.* 89, 1200-1206.
- Raghupathy R (1997) Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today* 18, 478-482.
- Raghupathy R, Makhseed M, Azizieh F, Hassan N, Al-Azemi M, Al-Shamali E (1999) Maternal Th1- and Th2-type reactivity to placental antigens in normal human pregnancy and unexplained recurrent spontaneous abortions. *Cell Immunol.* 196, 122-130.
- Redman CW, Sargent IL (2005) Latest advances in understanding preeclampsia. *Science* 308, 1592-1594.
- Redman CW, Sargent IL (2008) Circulating microparticles in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Placenta* 29, Suppl A: S73-77.
- Rosenn B, Miodovnik M, Combs CA, Khoury J, Siddiqi TA (1993) Poor glycemic control and antepartum obstetric complications in women with insulin-dependent diabetes. *Int J Gynaecol Obstet.* 43, 21-28.
- Roth I, Corry DB, Locksley RM, Abrams JS, Littpn MJ, Fisher SJ (1996) Human placental cytotrophoblasts produce the immunosuppressive cytokine interleukin 10. *J Exp Med.* 184, 539-548.
- Russell AS, Johnson C, Chew C, Maksymowych WP (1997) Evidence for reduced Th1 function in normal pregnancy: a hypothesis for the remission of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 24, 1045-1050.
- Saarela T, Hiltunen M, Helisalmi S, Heinonen S, Laakso M (2006) Polymorphisms of interleukin-6, hepatic lipase and calpain-10 genes, and preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 128, 175-179
- Sacks GP, Sargent IL, Redman CW (1998) Pregnancy is not a type 2 phenomenon, but a state of monocyte activation and relative lymphocyte suppression. *J Soc Gynecol Invest.* 5, 91A.
- Sacks GP, Studena K, Sargent K, Redman CW (1998a) Normal pregnancy and preeclampsia both produce inflammatory changes in peripheral blood leukocytes akin to those of sepsis. *Am J Obstet Gynecol.* 179, 80-86.
- Sacks GP, Sargent IL, Redman CW (1999) An innate view of human pregnancy. *Immunol Today* 20, 114-118.
- Sacks GP, Clover LM, Bainbridge DR, Redman CW, Sargent IL (2001) Flow cytometric measurement of intracellular Th1 and Th2 cytokine production by human villous and extravillous cytotrophoblast. *Placenta* 22, 550-559.
- Sacks GP, Redman CW, Sargent IL (2003) Monocytes are primed to produce the Th1 type cytokine IL-12 in normal human pregnancy: an intracellular flow cytometric analysis of peripheral blood mononuclear cells. *Clin Exp Immunol.* 131, 490-497.
- Sadowsky DW, Adams KM, Gravett MG, Witkin SS, Novy MJ (2006) Preterm labor is induced by intraamniotic infusions of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α but not by interleukin-6 or interleukin-8 in a nonhuman primate model. *Am J Obstet Gynecol.* 195, 1578-1589.
- Saito S, Umekage H, Sakamoto Y (1999a) Increased T-helper-1-type immunity and decreased T-helper-2-type immunity in patients with preeclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 41, 297-306.

- Saito S, Umekage H, Sakamoto Y, Sakai M, Tanebe K, Sasaki Y, Morikawa H (1999b) Increased T-helper-1-type immunity and decreased T-helper-2-type immunity in patients with preeclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 41, 297-306.
- Sakai M, Tsuda H, Tanebe K, Sasaki Y, Saito S (2002) Interleukin-12 secretion by peripheral blood mononuclear cells is decreased in normal pregnant subjects and increased in preeclamptic patients. *Am J Obstet Gynecol.* 47, 91-97.
- Sarkar S, Yong VW (2008) Inflammatory cytokine modulation of matrix metalloproteinase expression and invasiveness of glioma cells in a 3-dimensional collagen matrix. *J Neurooncol.* 19.
- Sasaki Y, Sakai M, Miyazaki S, Higuma S, Shiozaki A, Saito S (2004) Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Mol Hum Reprod.* 10, 347-353.
- Severa M, Fitzgerald KA (2007) TLR-mediated activation of type I IFN during antiviral immune responses: fighting the battle to win the war. *Curr Top Microbiol Immunol.* 316, 167-192.
- Siddiqi T, Rosenn B, Mimouni F, Khoury J, Miodovnik M (1991) Hypertension during pregnancy in insulin-dependent diabetic women. *Obstet Gynecol.* 77, 514-519.
- Sharma A, Satyam A, Sharma JB (2007) Leptin, IL-10 and inflammatory markers (TNF-alpha, IL-6 and IL-8) in pre-eclamptic, normotensive pregnant and healthy non-pregnant women. *Am J Reprod Immunol.* 58, 21-30.
- Shimojo N, Katsuki T, Tateno N, Tomiita M, Kohno Y (2008) T helper lymphocyte response to respiratory syncytial virus and its components in patients with respiratory allergy and nonatopic controls. *Int Arch Allergy Immunol.* 147, 110-116.
- Somerset DA, Zheng Y, Kilby MD, Sansom DM, Drayson MT (2004) Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset. *Immunology* 112, 38-43.
- Suzuki S, Kuwajima T, Yoneyama Y, Sawa R, Araki T (2002) Maternal peripheral T-helper 1-type and T-helper 2-type immunity in nonpreeclamptic twin pregnancies. *Gynecol Obstet Invest.* 53, 140-143.
- Svensson L, Arvola M, Sällström MA, Holmdahl R, Mattsson R (2001) The Th2 cytokines IL-4 and IL-10 are not crucial for the completion of allogeneic pregnancy in mice. *J Reprod Immunol.* 51, 3-7.
- Tam WH, Sahota DS, Lau TK, Li CY, Fung TY (2008) Seasonal variation in pre-eclamptic rate and its association with the ambient temperature and humidity in early pregnancy. *Gynecol Obstet Invest.* 66, 22-26.
- Tokoro Y, Matsuki Y, Yamamoto T, Suzuki T, Hara K (1997) Relevance of local Th2-type cytokine mRNA expression in immunocompetent infiltrates in inflamed gingival tissue to periodontal diseases. *Clin Exp Immunol.* 107, 166-174.
- Thompson, WW, Shay DK, Weintraub E, Brammer L, Cox N, Anderson LJ, Fukuda K (2003) Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *JAMA.* 289, 179-186.
- Trinchieri G (1993) Interleukin-12 and its role in the generation of Th1 cells. *Immunol Today* 14, 335-338.
- Van Engelen E, Breeveld-Dwarkasing VN, Taverne MA, Everts ME, Van der Weijden GC, Rutten VP (2008) MMP-2 expression precedes the final ripening process of the bovine cervix. *Mol Reprod Dev.* 75, 1669-1677
- Varner MW, Meehan RT, Syrop CH, Strottmann MP, Goplerud CP (1983) Pregnancy in patients with systemic lupus erythematosus. *Am J Obstet Gynecol.* 145, 1025-1040.

- Vince GS, Starkey PM, Austgulen R, Kwiatkowski D, Redman CW (1995) Interleukin-6, tumour necrosis factor and soluble tumour necrosis factor receptors in women with pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol.* 102, 20-25.
- Wilczyński JR, Tchórzewski H, Banasik M, Głowacka E, Wiecek A, Lewkowicz P, Malinowski A, Szpakowski M, Wilczyński J (2003) Lymphocyte subset distribution and cytokine secretion in third trimester decidua in normal pregnancy and preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 109, 8-15.
- Wille C, Renz H, Tekesin I, Hellmeyer L, Herz U, Schmidt S (2006) Suppression of IL-2 and IFN-gamma production in women with spontaneous preterm labor. *J Perinat Med.* 34, 20-27.
- Wikland M, Lindblom B, Wijkvist N (1984) Myometrial response to prostaglandins during labor. *Gynecol Obstet Invest.* 17, 131-138.
- Wolf M, Kettyle E, Sandler L, Ecker JL, Roberts J, Thadhani R (2001) Obesity and preeclampsia: the potential role of inflammation. *Obstet Gynecol.* 98, 757-762.
- Word RA, Kamm KE, Casey ML (1992) Contractile effects of prostaglandins, oxytocin, and endothelin-1 in human myometrium in vitro: refractoriness of myometrial tissue of pregnant women to prostaglandins E2 and F2 alpha. *J Clin Endocrinol Metab.* 75, 1027-1032.
- Yui J, Garcia-Lloret M, Wegmann TG, Guilbert LJ (1994) Cytotoxicity of tumour necrosis factor-alpha and gamma-interferon against primary human placental trophoblasts. *Placenta* 15, 819-835.
- Zhang JH, He H, Borzychowski AM, Takeda K, Akira S, Croy BA (2003) Analysis of cytokine regulators inducing interferon production by mouse uterine natural killer cells. *Biol Reprod.* 69, 404-411.
- Zenclussen AC, Fest S, Busse P, Joachim R, Klapp BF, Arck PC (2002) Questioning the Th1/Th2 paradigm in reproduction: peripheral levels of IL-12 are down-regulated in miscarriage patients. *Am J Reprod Immunol.* 48, 245-251.

